

氏 名	尾崎 加奈
学 位 の 種 類	博士 (栄養科学)
学 位 記 番 号	博栄甲第 0002 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
研 究 科 専 攻	栄養科学研究科 栄養科学専攻
学位論文題目	Evaluation method of Authenticity of Shiikuwasha ( <i>Citrus depressa</i> Hayata) juice (シークワシャー( <i>Citrus depressa</i> Hayata)果汁の真正評 価法に関する研究)
主論文公表雑誌	Food Science and Technology Research (第 12 巻,第 4 号,284 頁~289 頁,2006 年)
論文審査委員	(主査) 青峰 正裕 (副査) 太田 英明 (副査) 古賀 信幸

### 論文内容の要旨

[緒言] シークワシャー(*Citrus depressa* Hayata)は、沖縄本島北部を中心に分布する日本カンキツの原種の一つであり、近年、ノビレチン、タンゲレチンを中心とするポリメトキシフラボン類が高濃度含まれることが明らかにされている。一般にフラボン化合物を含むフラボノイド類は基本骨格に水酸基が置換基として結合している。これに対して、ノビレチンの置換基はメトキシシル基が 6 個、タンゲレチンは同 5 個を結合する化学構造を有する。このノビレチンは、マウス皮膚、ラット大腸で、発ガン抑制作用があること、紫外線照射による炎症原因物質であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生を抑制すること、などが報告されている。これらの報告や消費者の健康志向などを背景に、シークワシャー果汁製品の需要が急速に高まり、その原料が著しく不足した。一方で、シークワシャーに一見類似したカラマンシー (和名:シキキツ、*Citrus madurensis* Lour.)があるが、この果汁が「シークワシャー果汁」としてアジアから沖縄に輸入され、シークワシャー果汁として使われるという不正事態が多発した。本論文は、シークワシャー果汁の真正性を確保するために、シークワシャー果汁に存在するポリメトキシフラボンであるノビレチンやタンゲレチンなどの非極性成分の微量分析に適用可能なミセル動電キャピラリークロマトグラフィー (MEKC) の適用を試みた。次に、ポリメトキシフラボンのシネンセチンを指標に加え、かつカラマンシー果汁に存在する独特のカルコンである 3',5'-C-ジグルコピラノシルフロレ

チン(フロレチン配糖体)を指標化合物とする評価方法を検討した。

[実験材料および方法] 農林水産省果樹試験場カンキツ部より入手したカンキツ 45 品種および沖縄県農業試験場名護支場より入手したシークワシャー1 品種の計 46 品種からアルベド部を採取し、凍結乾燥後粉碎したものに抽出溶媒を加えホモジネート、超音波抽出、遠心分離後、上清液を集め分析試料とした。果汁試料は、沖縄経済連農産加工場の純正シークワシャー果汁と台湾台中市佳美食品工業からの純正カラマンシー果汁を対照に、市販品 12 種類(うちシークワシャー果汁 100%表示品 8 種類)を入手した。

MEKC 法に用いたキャピラリー (CE) 電気泳動装置は、Quanta4000E、フューズドシリカ素管 (60cm×75  $\mu$ m) を使用し、印加電圧 21kV、検出波長 214nm の条件で測定を行った。

TLC および HPLC: 純正および市販果汁試料を、洗浄した Sep-Pak カラムに通過させ、純水とメタノールで処理し、再びメタノールで溶出させたものを TLC 用試料とした。また、試料 3ml にエタノール 7ml を添加し、超音波で 30 分間抽出を行い、上澄みを HPLC 用試料とした。TLC の検出は、試料とフロレチン配糖体の標準品を並べて TLC プレートにスポットし、クロロホルム:メタノール:水 (65:35:5) で展開後、10%硫酸を噴霧し、ガスバーナー上で加熱し、発色させた。

HPLC は、島津製 LC-10AD 装置を利用し、紫外線検出器 SPD-10AV を使用した。カラムは MERCK 社製 LiChrospher100:RP-18 (125×4i. d., 粒径 5  $\mu$ m) を使用した。

[結果および考察] MEKC 法はキャピラリー (CE) 電気泳動法の特殊な方法であり、ミセルを形成する界面活性剤 (sodium dodecyl sulfate (SDS)) を含む緩衝液を遊離液として利用、対象化合物のミセルおよび泳動液に対する分配比によって分離する方法である。本研究では、最適な遊離液として、32mM SDS を含有する 20mM リン酸ナトリウム、12mM 四ホウ酸二ナトリウムおよび 20%メタノールから成る緩衝液 (pH7.0) を選択し超微量の簡易かつ迅速な定量を可能にした。設定した条件を利用してカンキツ類 46 種類を分析し、そのうち 17 種類に対象のノビレチンとタンゲレチンが存在することを認めた。田中のカンキツ分類に従えば、対象成分は後生カンキツ属ミカン区に集中して分布し、とりわけコミカン亜区で含量の高いことを明らかにした。一方、カラマンシーはトウキンカン区に属し、対象成分はシークワシャーに比べて 1/10 程度であり、両成分とも指標化合物として利用可能なことが推察された。

フロレチン配糖体がトウキンカン区、キンカン属、カラタチ属に存在するとの報告から、カラマンシー果汁を含む果汁試料から調製した試料を用いて、TLC で検出する方法を検討した。その結果、フロレチン配糖体の標準品と一致するスポット ( $R_f$ :0.2) は、カラマンシー果汁および混入果汁に存在することを認め、カラマンシー果汁および類似果汁の混入を簡易に検出する方法を示した。また、純正シークワシャー果汁、純正カラマンシー果汁、それらの混合品中の、フロレチン配糖体、ノビレチン、タンゲレチンおよびシネンセチンの HPLC 分析によって、市販果汁の混入程度が推察可能となった。最後に、シークワシャー果汁 100% 表示品 8 試料を分析した結果、その 7 種類に高濃度のフロレチン配糖体を検出し、ノビレ

チン、タンゲレチン、シネンセチン 3 成分の低含量も、純正カラマンシー果汁のそれと酷似しており、不正品と判別できた。

以上から、新規の分析法によるポリメトキシフラボンの分析法を確立するとともに、フロレチン配糖体、ノビレチン、タンゲレチン、シネンセチン 3 成分の指標化合物とするシークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 果汁の真正評価法を確立した。

## 論文審査結果の要旨

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) は、沖縄本島北部を中心に分布する日本カンキツの原種の一つであり、近年、nobiletin、tangeretin を中心とするポリメトキシフラボン類が高濃度含まれることが明らかにされている。最近、nobiletin がマウス皮膚、ラット大腸で、発ガン抑制作用があること、紫外線照射による炎症原因物質であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生を抑制すること、などが報告されたことを受けて、シークワシャー果汁製品の需要が急速に高まり、その原料が著しく不足した。一方で、シークワシャーに一見類似したカラマンシー (和名: シキキツ、*Citrus madurensis* Lour.) があるが、この果汁が「シークワシャー果汁」としてアジアから沖縄に輸入され、シークワシャー果汁として使われるという不正事態が多発した。

本研究では、シークワシャー果汁の真正性を確保するために、シークワシャー果汁に存在するポリメトキシフラボンである nobiletin や tangeretin などの非極性成分の微量分析に適用可能なミセル動電キャピラリークロマトグラフィー (MEKC 法) の応用を試み、新規分析法の開発に成功した。また、本法を用いてカンキツ分類に従って試料を分析し、対象成分が後生カンキツ属ミカン区に集中して分布し、とりわけシークワシャーが属するコミカン亜区でその含量の高いことを明示した。一方、不正品に利用されるカラマンシーがトウキンカン区に属し、対象成分はシークワシャーに比べて 1/10 程度であり、両成分とも指標化合物として利用可能としている。

次に、ポリメトキシフラボンの sinensetin を指標に加え、かつカラマンシー果汁に存在する独特のカルコンである 3',5'-C-diglucopyranosylphloretin (フロレチン配糖体) を指標化合物とする簡易な評価方法を検討した。その結果、カラマンシー果汁および類似果汁の混入を簡易に検出する方法を開発し、市販品に対する適用試験でその有用性を証明した。

本論文は、ポリメトキシフラボンである nobiletin、tangeretin に対する新規な分析法を開発するとともに、フロレチン配糖体とポリメトキシフラボンを指標化合物に利用する、簡易・迅速なシークワシャー果汁の真正性を評価する方法を確立しており、本学の学位論文として適格であると判断した。

## 最終試験結果の要旨

申請者に対して以下の質問を行った。

1. 二次代謝産成分について説明せよ。
2. シークワシャー果汁にポリメトキシフラボノイドが多い理由、またポリメトキシフラボノイドのシークワシャー果実における機能を述べよ。
3. アルベドにポリメトキシフラボノイドが多い理由を述べよ。
4. MEKC法の原理(移動比等)について説明せよ。
5. Migration Timeの定義を説明せよ。
6. キャピラリー電気泳動法を用いた理由を述べよ。
7. HPLC法とMEKC法の感度の比較、MEKC法の利点(微量成分の検出のみか)について述べよ。
8. フロレチン配糖体にみられる特有のC-C結合を有する他の化合物を挙げよ。
9. PCRによるDNA検出法を用いない理由を述べよ。
10. HPLC法とMEKC法の検出時間の比較について説明せよ。
11. TLCのH果汁のスポットがR<sub>f</sub>値0.2より高い位置に出ている理由を述べよ。
12. TLC法の展開時間、及び条件の検討について説明せよ。
13. MEKC法のフェログラム(他のポリメトキシフラボンのピークは検出されたのか)
14. カラマンシーとシークワシャー果汁を飲んで違いが分かるか。  
他の評価法は検討しているのか。
15. nL単位のものをどのようにしてインジェクションしたのか。

### 審査結果

専門的な見地から、研究内容に対して、また関連分野に対して質疑を行った。的確な回答が得られたので、最終試験に合格したものと判定した。